

Cara uji mikrobiologi - Bagian 1: Penentuan koliform dan *Escherichia coli* pada produk perikanan



© BSN 2015

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Prinsip.....	2
4 Peralatan	2
5 Media dan pereaksi	2
6 Kondisi pengujian	3
7 Penyiapan contoh	3
8 Prosedur	3
Lampiran A	10
Lampiran B	14
Lampiran C	17
Bibliografi	19



Prakata

Dalam rangka memberikan jaminan mutu dan keamanan pangan terhadap komoditas yang akan dipasarkan di dalam dan luar negeri, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) metode uji yang dapat memenuhi jaminan tersebut.

Standar ini merupakan revisi dari:

SNI 01-2332.1-2006, Cara Uji Mikrobiologi - Bagian 1: Penentuan coliform dan *Escherichia coli* pada produk perikanan.

Bagian yang direvisi adalah suhu inkubasi pada tahap penegasan koliform. Selain itu, proses pengujian penentuan koliform dan *Escherichia coli* pada SNI ini juga mencantumkan prosedur menggunakan metode MUG (*methyumbelliferyl β-D-glucuronide*).

Standar ini disusun oleh Komite Teknis 65-05: Produk Perikanan melalui rapat teknis dan rapat konsensus pada tanggal 20 Oktober 2014 di Jakarta yang dihadiri oleh anggota Komite Teknis 65-05: Produk Perikanan sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keamanan pangan.

Berkaitan dengan penyusunan SNI ini, maka aturan yang dijadikan dasar atau pedoman adalah Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. PER.019/MEN/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 15 Januari 2015 sampai dengan 16 Maret 2015 dengan hasil akhir RASNI.

Cara uji mikrobiologi – Bagian 1: Penentuan koliform dan *Escherichia coli* pada produk perikanan

1 Ruang lingkup

Standar ini digunakan untuk menentukan bakteri indikator sanitasi koliform dan *Escherichia coli* (*E. coli*) pada produk perikanan. Pada pengujian produk perikanan selain moluska bercangkang dua (*bivalve*) yang tidak dingin dan beku dapat menggunakan metode konvensional sedangkan untuk produk dingin dan beku dapat menggunakan LST-MUG. Untuk daging *shellfish* dapat menggunakan metode konvensional dan EC-MUG.

2 Istilah dan definisi

Untuk keperluan penyusunan standar ini, digunakan istilah dan definisi sebagai berikut:

2.1

koliform

kelompok bakteri yang digunakan sebagai indikator adanya polusi kotoran dan kondisi sanitasi yang tidak baik

2.2

fekalkoliform

kelompok bakteri fakultatif aerob, gram negatif tidak membentuk spora, berbentuk batang pendek, mampu memfermentasikan laktosa dengan menghasilkan gas

2.3

E. coli

bakteri Gram-negatif yang berbentuk batang pendek atau *coccus*, tidak membentuk spora

2.4

inkubasi

pengkondisian mikroorganisme untuk tumbuh dan berkembang biak sesuai dengan suhu dan waktu yang diperlukan

2.5

shellfish

semua jenis (*species*) ikan yang mempunyai cangkang luar (eksoskeleton) yaitu moluska, krustase, dan ekinodermata

2.6

moluska bercangkang dua (*bivalve*)

semua jenis (*species*) moluska yang mempunyai cangkang dua antara lain, *oyster* (*Pinctada* sp), kepah (*Meritrix meritrix*), tiram (*Crassostrea cuculata*), simping (*Common minolowpen*), remis, kijing, dan kerang lainnya

2.7

media

nutrisi dalam bentuk padat atau cair untuk tempat pertumbuhan mikroorganisme

2.8

metode angka paling mungkin/APM

metode untuk menghitung jumlah mikroba dengan menggunakan media cair dalam tabung reaksi, pada umumnya setiap pengenceran 3 seri atau 5 seri tabung dan perhitungan yang dilakukan merupakan tahapan pendekatan secara statistik

2.9

produk perikanan

ikan termasuk biota perairan lainnya yang ditangani dan/atau diolah untuk dijadikan produk akhir, umumnya berupa ikan segar, ikan beku dan olahan lainnya yang digunakan untuk konsumsi manusia

2.10

koloni terduga (*suspected colonies*)

koloni-koloni pada media agar selektif yang memberikan karakteristik *E.coli*, yang harus dikonfirmasi untuk meyakinkan benar tidaknya *E.coli*

3 Prinsip

Menumbuhkan bakteri dalam tabung pengenceran seri dan perhitungan dilakukan sesuai tabel APM berdasarkan jumlah tabung yang positif setelah diinkubasi pada suhu dan waktu tertentu.

4 Peralatan

- *waterbath* tertutup dengan sirkulasi $45.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}^{\text{a}}$;
- inkubator $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}^{\text{b}}$;
- *blender* beserta jar yang dapat disterilisasi atau *stomacher*;
- botol pengencer;
- tabung Durham;
- cawan Petri ukuran 15 mm x 90 mm;
- lampu UV dengan panjang gelombang 365 nm;
- tabung reaksi ukuran 16 mm x 150 mm dan 13 mm x 100 mm;
- timbangan dengan kapasitas $\geq 2\text{ kg}$ dan sensitifitas 0,1 g;
- mikroskop;
- pipet atau *pippetor* 1 mL, 5 mL dan 10 mL;
- jarum Ose.

CATATAN ^a Suhu *waterbath* untuk pengujian *shellfish* adalah $44,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tinggi air harus lebih tinggi dari tinggi cairan yang ada dalam tabung yang akan diinkubasi.

^b Suhu inkubator untuk pengujian *shellfish* adalah $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5 Media dan pereaksi

- *brilliant green lactose bile* (BGLB), 2% *broth* (B.1);
- *lauryl tryptose broth* (LTB) (B.2);
- EC *broth* (B.3);
- *Levine's eosin methylen blue* (L-EMB) agar (B.4);
- *tryptone (tryptophane) broth* (TB) (B.5);
- MR-VP *broth* (B.6);
- *Simmon Citrate Agar* (B.7);
- *plate count agar* (B.8);

- lactose broth (B.9);
- LST-MUG Medium (B.10)
- EC-MUG Medium (B.11);
- larutan *Butterfield's phosphate buffer* (C.1);
- larutan 0,5% *pepton water* (C.2);
- pereaksi *Kovacs* (C.3);
- pereaksi *Voges-Proskauer* (C.4);
- indikator *methyl red* (C.5);
- pereaksi pewarnaan *Gram* (C.6).

CATATAN Pembuatan media diuraikan dalam Lampiran B dan pembuatan pereaksi diuraikan dalam Lampiran C.

6 Kondisi pengujian

Pengujian contoh *shellfish* menggunakan metode APM5 seri tabung, sedangkan untuk produk perikanan lainnya menggunakan APM3 atau 5 seri tabung.

7 Penyiapan contoh

Dengan menerapkan teknis aseptis, contoh diambil secara acak dan dipotong kecil-kecil hingga berat masing-masing contoh yang akan diuji sesuai dengan ketentuan pada Tabel 1.

Contoh beku dilelehkan pada saat akan dianalisa dan pelelehan dilakukan selama 18 jam pada suhu sekitar 2 °C – 5 °C atau suhu di bawah 45 °C dan tidak lebih dari 15 menit.

Tabel 1 - Berat contoh yang diambil yang akan diuji

Berat contoh	Berat contoh yang akan diuji
< 1 kg atau 1 L	100 g atau 100 mL
1 kg atau 1 L– 4,5 kg atau 4,5 L	300 g atau 300 mL
> 4,5 kg atau 4,5 L	500 g atau 500 mL

8 Prosedur

8.1 Persiapan pengujian

- Untuk contoh dengan berat lebih kecil atau sama dengan 1 kg atau 1 L sampai dengan 4,5 kg atau 4,5 L timbang contoh padat sebanyak 25 g atau contoh cair sebanyak 25 mL dari contoh yang akan diuji, kemudian masukkan dalam wadah atau plastik steril dan tambahkan 225 mL larutan *Butterfield's phosphate buffer*.
- Untuk contoh dengan berat lebih besar dari 4,5 kg atau 4,5 L timbang contoh padat sebanyak 50 g atau contoh cair sebanyak 50 mL, kemudian masukkan dalam wadah atau plastik steril dan tambahkan 450 mL larutan *Butterfield's phosphate buffer*.
- Untuk *shellfish*, siapkan 200 g cairan dan daging *shellfish* yang berasal dari 10 – 12 *shellfish*. Masukkan dalam wadah atau plastik steril dan tambahkan 200 mL larutan *buffered phosphate water* atau 0,5% *peptone water*.
- Homogenkan selama 2 menit. *Homogenat* ini merupakan larutan dengan pengenceran 10^{-1} .

8.2 Tahap pengujian

8.2.1 Uji APM untuk semua produk perikanan

8.2.1.1 Uji pendugaan koliform (*Presumptive coliform*)

8.2.1.1.1 Uji pendugaan koliform (*Presumptive coliform*) selain produk *shellfish*

- Siapkan pengenceran 10^{-2} dengan cara melarutkan 1 mL larutan 10^{-1} ke dalam 9 mL larutan pengencer *butterfield's phosphate buffer*. Lakukan pengenceran selanjutnya sesuai dengan pendugaan kepadatan contoh. Pada setiap pengenceran dilakukan pengocokan minimal 25 kali.
- Pindahkan dengan menggunakan pipet steril, sebanyak 1 mL larutan dari setiap pengenceran ke dalam 3 atau 5 tabung *lauryl tryptose broth* (LTB) yang berisi tabung Durham. Media lactosebroth juga dapat digunakan.
- Inkubasi tabung-tabung tersebut pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Perhatikan gas yang terbentuk setelah inkubasi $24\text{ jam} \pm 2\text{ jam}$. Tabung positif ditandai dengan kekeruhan dan gas dalam tabung Durham. Inkubasikan kembali tabung-tabung negatif selama 24 jam dan catat hasilnya pada $48\text{ jam} \pm 3\text{ jam}$.
- Lakukan "uji penegasan koliform" untuk tabung-tabung positif.

8.2.1.1.2 Uji pendugaan koliform (*presumptive coliform*) untuk daging *shellfish*

- Ke dalam 5 tabung yang berisi 10 mL *lactosebroth* atau *lauryltryptosebroth* dan tabung Durham, masukkan masing-masing 2 mL homogenat (setara dengan 1 g *shellfish*), 1 mL pengenceran homogenat 1:10 (setara dengan 0,1 g *shellfish*), 1 mL pengenceran homogenat 1:100 (setara dengan 0,01 g *shellfish*), dan 1 mL pengenceran homogenat 1:1000 (setara dengan 0,001 g *shellfish*). Pengenceran lanjutan mungkin diperlukan untuk mencegah hasil uji yang tidak dapat terbaca.
- Inkubasi tabung-tabung tersebut pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Perhatikan gas yang terbentuk setelah inkubasi $24\text{ jam} \pm 2\text{ jam}$ dan catat hasilnya. Tabung positif ditandai dengan kekeruhan dan gas dalam tabung *Durham*. Inkubasikan kembali tabung-tabung negatif selama 24 jam dan catat kembali hasilnya pada $48\text{ jam} \pm 3\text{ jam}$.
- Lakukan "Uji penegasan koliform" untuk tabung-tabung positif.

8.2.1.2 Uji penegasan koliform (*confirmed coliform*)

- Inokulasikan tabung-tabung LTB yang positif ke tabung-tabung BGLB *Broth* yang berisi tabung *durham* dengan menggunakan jarum Ose. Inkubasi BGLB *Broth* yang telah diinokulasi pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Periksa tabung-tabung BGLB yang menghasilkan gas selama $48\text{ jam} \pm 3\text{ jam}$ pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tabung positif ditandai dengan kekeruhan dan gas dalam tabung *Durham*.
- Tentukan nilai angka paling memungkinkan (APM) untuk koliform berdasarkan jumlah tabung-tabung BGLB yang positif dengan menggunakan Angka Paling Memungkinkan (APM). Nyatakan angka koliform sebagai "APM/g" untuk produk perikanan selain *shellfish*, dan APM/100 g untuk produk *shellfish*. Apabila pengujian menggunakan 3 seri tabung pengenceran gunakan tabel B.1 pada lampiran A dan apabila pengujian menggunakan 5 seri tabung pengenceran gunakan tabel C.1 pada Lampiran A.

8.2.1.3 Uji pendugaan *E.coli* (*faecal coliform, presumptive E.coli*)

- Untuk produk perikanan selain *shellfish*, inokulasikan dari setiap tabung LTB yang positif ke tabung-tabung EC *Broth* yang berisi tabung *Durham* dengan menggunakan jarum

Ose. Inkubasi EC *Broth* dalam *waterbath* sirkulasi selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu $45,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. *Waterbath* harus dalam keadaan bersih, air di dalamnya harus lebih tinggi dari tinggi cairan yang ada dalam tabung yang akan diinkubasi.

- b) Periksa tabung-tabung EC *Broth* yang menghasilkan gas selama 24 jam \pm 2 jam, jika negatif inkubasikan kembali dan periksa pada 48 jam \pm 2 jam. Tabung positif ditandai dengan kekeruhan dan gas dalam tabung *Durham*.
- c) Untuk produk *shellfish*, inokulasikan dari setiap tabung LTB atau *lactose broth* yang positif ke tabung-tabung EC *Broth* yang berisi tabung *Durham* dengan menggunakan jarum Ose. Inkubasi EC *Broth* dalam *waterbath* sirkulasi selama 24 jam \pm 2 jam pada suhu $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. *Waterbath* harus dalam keadaan bersih, air di dalamnya harus lebih tinggi dari tinggi cairan yang ada dalam tabung yang akan diinkubasi. Tabung positif ditandai dengan kekeruhan dan gas dalam tabung *Durham*.
- d) Tentukan nilai angka paling memungkinkan (APM) berdasarkan jumlah tabung-tabung EC yang positif dengan menggunakan Angka Paling Memungkinkan (APM). Nyatakan angka fekal koliform sebagai "APM/g" untuk produk perikanan selain *shellfish*, dan "APM/100 g" untuk produk *shellfish*. Apabila pengujian menggunakan 3 seri tabung pengenceran gunakan tabel A.2 pada Lampiran A dan apabila pengujian menggunakan 5 seri tabung pengenceran gunakan tabel A.3 pada Lampiran A.

8.2.1.4 Uji penegasan *E.coli* (confirmed *E.coli*)

- a) Dari tabung-tabung EC *broth* yang positif dengan menggunakan jarum Ose goreskan ke L-EMB agar. Inkubasi selama 18 - 24 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.
- b) Koloni *E. coli* terduga memberikan ciri yang khas (*typical*) yaitu hitam pada bagian tengah, datar dan dengan atau tanpa hijau metalik.
- c) Ambil sampai dengan 5 koloni (*typical*) *E. coli* dari masing-masing cawan L-EMB dan goreskan ke media PCA miring dengan menggunakan jarum Ose. Inkubasi selama 18 jam - 24 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ dan gunakan untuk pengujian selanjutnya.

CATATAN: 1 dari 5 koloni yang teridentifikasi sebagai *E. coli* cukup untuk menyatakan bahwa tabung EC positif, sehingga kelima koloni tersebut tidak perlu diuji.

8.2.1.5 Uji morfologi

Lakukan uji morfologi menggunakan mikroskop dengan melakukan pewarnaan gram dari setiap koloni *E. coli* terduga. Biakan diambil dari PCA yang telah diinkubasi selama 24 jam (8.2.1.4.c). Semua kultur yang tampak sebagai Gram-negatif, berbentuk batang pendek harus dilakukan uji biokimia dan diinokulasi kembali kedalam media LTB untuk memastikan terbentuknya gas.

8.2.1.6 Uji Biokimia

a) Produksi *Indol*

Inokulasikan 1 Ose dari PCA miring (8.2.1.4.c) ke dalam *tryptone broth* dan inkubasi selama 24 jam \pm 2 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Uji *indol* dilakukan dengan menambahkan 0,2 mL – 0,3 mL pereaksi Kovacs. Reaksi positif jika terbentuk cincin merah pada lapisan bagian atas media dan negatif bila terbentuk cincin warna kuning.

b) Uji *Voges Proskauer*

Inokulasikan 1 Ose dari PCA miring ke dalam MRVP *Broth*. Inkubasikan selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Pindahkan sebanyak 1 mL dari setiap MRVP *broth* yang tumbuh ke tabung reaksi ukuran 13 mm x 100 mm steril dan tambahkan 0,6 mL larutan

alpha naphthol dan 0,2 mL 40% KOH, kocok, tambahkan sedikit kristal keratin untuk mempercepat reaksi. Kocok kembali dan diamkan selama 2 jam. Reaksi positif jika terbentuk warna merah muda *eosin* sampai merah delima (*ruby*).

c) Uji *Methyl red*

Inkubasikan kembali MRVP *broth* di atas (8.2.1.6.b) selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu 35 °C \pm 0,5 °C. Tambahkan 5 tetes indikator *methyl red* pada setiap MRVP *broth*. Reaksi positif jika terbentuk warna merah dan negatif jika terbentuk warna kuning.

d) Uji sitrat

Goreskan 1 Ose dari PCA miring (8.2.1.4.c) ke permukaan *Simmon Citrate* agar. Inkubasi selama 96 jam pada suhu 35 °C \pm 0,5 °C. Reaksi positif jika terjadi pertumbuhan dan media berubah warna menjadi biru, reaksi negatif jika tidak ada pertumbuhan dan media tetap hijau.

e) Produksi gas dari laktosa

Inokulasikan 1 Ose dari PCA miring (8.2.1.4.c) kedalam LTB. Inkubasi selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu 35 °C \pm 0,5 °C reaksi positif jika menghasilkan gas pada tabung *Durham*.

CATATAN: Sebagai alternatif dalam melakukan uji IMViC, gunakan API20E atau uji biokimia otomatis VITEK untuk mengidentifikasi organisme sebagai *E. coli*. Gunakan isolat yang berasal dari PCA miring dan lakukan pengujian sesuai petunjuk manufaktur.

f) Interpretasi hasil

Semua kultur yang (a) memfermentasi lactose dan menghasilkan gas dalam 48 jam pada 35 °C, (b) mencirikan Gram-negatif, berbentuk batang tanpa spora dan (c) uji IMViC memberikan pola ++- (biotype 1) or -+- (biotype 2) dipertimbangkan sebagai *E. coli* seperti yang tercantum pada tabel 2.

Tabel 2 - Interpretasi hasil

Kriteria	Biotipe 1	Biotipe 2
Gas pada tabung LTB	+	+
Indol	+	-
Methyl Red (MR)	+	+
Voges Proskauer (VP)	-	-
Sitrat	-	+
Uji Morfologi	Gram negatif, bentuk batang pendek tidak berspora	Gram negatif, bentuk batang pendek tidak berspora

Tentukan nilai angka paling memungkinkan (APM) berdasarkan jumlah tabung-tabung EC positif dari 3 pengenceran yang berturutan. Nyatakan *E.coli* sebagai "APM/g" untuk produk perikanan selain *shellfish*, dan "APM/100 g" untuk produk *shellfish*.

8.2.2 Metode Uji LST-MUG untuk pengujian *E. coli* pada produk perikanan dingin dan beku selain moluska bercangkang dua (*bivalve*)

8.2.2.1 Metode LST-MUG Assay didasarkan pada aktivitas enzim β - glucuronidase (GUD) yang memecah substrat 4-methylumbelliferyl β -D-glukuronide (MUG) untuk melepaskan 4-methylumbelliferone (MU). Bila dipaparkan pada sinar UV dengan panjang gelombang 365

nm, MU menampilkan fluoresensi kebiruan yang mudah divisualisasikan dalam media mikrobiologi atau sekitar koloni. Lebih dari 95% *E. coli* menghasilkan GUD, termasuk strain anaerogenik (tidak membentuk gas). Satu pengecualian adalah *enterohemorrhagic E. coli* (EHEC) dari serotipe O157:H7, yang secara konsisten GUD negatif. Kurangnya fenotipe GUD pada O157:H7 sering digunakan untuk membedakan serotipe ini dari *E. coli* lain, meskipun varian GUD O157:H7 positif memang ada. Anggota famili Enterobacteriaceae jarang memproduksi GUD kecuali untuk beberapa shigellae (44% - 58%) dan salmonellae (20% - 29%). Namun, deteksi patogen ini dengan uji GUD tidak dianggap sebagai kelemahan dari perspektif kesehatan masyarakat. Ekspresi aktivitas GUD dipengaruhi oleh represi katabolit sehingga ada kalanya beberapa *E. coli* menghasilkan GUD-negatif, meskipun mereka membawa gen *uidA* (*gusA*) yang mengkodekan enzim. Akan tetapi, pada kebanyakan analisa, sekitar 96% dari isolat *E. coli* yang diuji adalah GUD-positif tanpa perlu induksi enzim.

MUG dapat dimasukkan kedalam hampir semua media mikrobiologi untuk mendeteksi *E. coli*. Namun demikian, beberapa media seperti L-EMB yang mengandung bahan berpendar tidak sesuai, karena bahan tersebut akan menutupi fluoresensi dari MU. Ketika MUG dimasukkan ke dalam media LST, koliform dapat dihitung atas dasar pembentukan gas dari laktosa dan uji pendugaan *E. coli* dilakukan dengan mengamati fluoresensi dalam media mikrobiologi dibawah panjang gelombang sinar UV. Fluoresensi dalam media mampu mengidentifikasi *E. coli* secara presumtif dalam waktu 24 jam. Metode LST-MUG ini telah diadopsi sebagai *Official Final Action* oleh AOAC untuk pengujian untuk *E. coli* dalam makanan dingin atau beku kecuali *shellfish*.

CATATAN: Lihat 8.2.3 terkait hal yang perlu diperhatikan dalam menggunakan MUG untuk pengujian *shellfish*.

PERHATIAN: Untuk mengamati adanya fluoresensi, periksa tabung LST-MUG yang diinokulasi dibawah panjang gelombang sinar UV (365 nm) dalam ruangan gelap. Lampu genggam UV 6 watt cukup memadai dan aman. Bila menggunakan sinar UV yang lebih kuat, seperti lampu fluoresensi 15 watt, gunakan kacamata pelindung atau kacamata biasa. Selain itu, periksa semua tabung gelas untuk mengetahui adanya auto fluoresensi sebelum digunakan dalam pengujian MUG. Cerium oksida, yang kadang-kadang ditambahkan kedalam tabung sebagai pengukuran dalam pengawasan mutu akan berpendar di bawah sinar UV dan mengganggu uji MUG. Penggunaan kontrol positif dan negatif untuk reaksi MUG sangat penting.

8.2.2.2 Peralatan dan bahan

Lihat pasal 4 dengan penambahan:

- Tabung reaksi baru, sekali pakai (100 mm x 16 mm)
- Tabung *Durham* baru, sekali pakai (50 mm x 9 mm)
- Lampu dengan panjang gelombang sinar UV, tidak melebihi 6 watt

8.2.2.3 Media dan pereaksi

Mengacu pada pasal 5.

8.2.2.4 Uji pendugaan LST-MUG untuk *E. coli*

- a) Penyiapan contoh mengacu pada pasal 7 dan persiapan pengujian mengacu pada 8.1.
- b) Proses pengujian pendugaan koliform mengacu pada 8.2.1.1.1 namun digunakan media LST yang ditambah reagen MUG.
- c) Inokulasi satu tabung LST-MUG dengan isolat *E. coli* GUD-positif (ATCC 25922). sebagai kontrol positif dan inokulasi tabung lain dengan *Enterobacter aerogenes* (ATCC

- 13048) atau strain *Klebsiella pneumoniae* sebagai kontrol negatif untuk membedakan tabung tabung sampel yang hanya menunjukkan pertumbuhan dengan tabung tabung yang menunjukkan pertumbuhan dan fluoresensi.
- Inkubasi semua tabung pada suhu 35 °C selama 24 jam - 48 jam ± 2 jam. Amati pertumbuhan (kekeruhan, gas) pada setiap tabung kemudian lakukan pengamatan dalam ruangan gelap menggunakan lampu UV dengan panjang gelombang 365 nm. Warna kebiruan yang berpendar menunjukkan hasil uji positif untuk presumtif *E. coli*. Fluoresensi yang terbaca setelah 24 jam inkubasi merupakan petunjuk yang akurat adanya *E. coli* dan dapat mengidentifikasi 83 - 95% tabung *E. coli* positif. Setelah 48 jam inkubasi, 96% - 100% tabung tabung positif *E. coli* dapat diidentifikasi.
 - Lakukan uji konfirmasi *E. Coli* terhadap semua tabung presumtif positif dengan menginokulasi tabung – tabung positif LST-MUG pada media L–EMB agar.
 - Inkubasi pada suhu 35 °C selama 24 jam ± 2 jam.
 - Tentukan nilai angka paling memungkinkan (APM) berdasarkan jumlah tabung-tabung LST-MUG yang positif dengan menggunakan Angka Paling Memungkinkan (APM). Nyatakan nilainya sebagai “APM/g”.
 - Lakukan uji konfirmasi *E. coli* mengacu pada 8.2.1.5 dan 8.2.1.6.
 - Tentukan nilai angka paling memungkinkan (APM) *E. Coli* berdasarkan jumlah tabung-tabung LST-MUG yang positif dalam 3 pengenceran yang berturutan. Nyatakan nilainya sebagai APM/g.

8.2.3 Metode Uji EC-MUG untuk pengujian *E. coli* pada daging *shellfish*

8.2.3.1 Uji MUG β -glucuronidase (GUD) untuk mendeteksi *E. coli* pada makanan dingin dan beku seperti yang diuraikan pada 8.2.2 dapat juga digunakan untuk pengujian *E. coli* pada daging *shellfish*; tetapi dengan sedikit modifikasi (lihat catatan). Hal ini disebabkan karena makanan seperti daging *shellfish* mengandung aktivitas GUD alami. Akibatnya, homogenat tiram yang diinokulasi langsung ke tabung LST-MUG dalam tahap presumtif pada uji APM dapat menyebabkan reaksi fluoresensi positif palsu (*False positive*). Oleh karena itu, dalam pengujian *E. coli* pada daging *shellfish*, reagen MUG ditambahkan kedalam media EC dan digunakan pada tahap konfirmasi. Tabung tabung EC-MUG yang diinkubasi pada 44,5 °C ± 0,2 °C dapat digunakan dalam tahap konfirmasi pada 5 tabung uji APM konvensional untuk menentukan nilai fekal koliform daging *shellfish*. Nilai APM *E. coli* dapat diperoleh dengan mengamati fluoresensi pada tabung di bawah panjang gelombang UV.

CATATAN: Lihat pasal 4 dan 5 diatas untuk bahan dan reagen yang dibutuhkan. Gunakan dehidrat EC-MUG komersial, atau siapkan media dengan menambahkan MUG kedalam EC broth (0,05 g/L) (D.11). Pipet 5 mL ke dalam tabung kaca borosilikat baru (100 mm × 16 mm) yang berisi tabung *Durham* (50 mm × 9 mm) untuk pembentukan gas. Sterilisasi tabung tabung EC-MUG broth pada suhu 121 °C selama 15 menit; simpan sampai 1 minggu pada suhu kamar atau sampai 1 bulan dalam lemari pendingin.

8.2.3.2 Tahapan uji EC-MUG

- Inokulasikan dari setiap tabung lactose broth atau *lauryl tryptose broth* (mengacu pada 8.2.1.1.2) yang positif ke tabung-tabung EC Broth yang telah ditambahkan reagen MUG dengan menggunakan jarum Ose.
- Gunakan 3 tabung kontrol, satu diinokulasi dengan *E. coli* sebagai kontrol positif; satu dengan *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) atau *K. pneumoniae* sebagai kontrol negatif; dan tabung yang tidak diinokulasi sebagai kontrol EC-MUG medium.
- Inkubasi semua tabung EC-MUG dalam *waterbath* sirkulasi pada suhu 44,5 °C ± 0,2 °C selama 24 jam. *Waterbath* harus dalam keadaan bersih, air di dalamnya harus lebih tinggi dari tinggi cairan yang ada dalam tabung yang akan diinkubasi.

- d) Amati tabung-tabung EC–MUG dalam ruang gelap dengan menggunakan lampu UV dengan panjang gelombang 365 nm.
- e) Positif *E. coli* ditandai dengan warna kebiruan di bawah sinar lampu UV dan kekeruhan serta gas pada tabung. Beberapa (<10%) *E. coli* bersifat anaerogenic (gas-negatif), tetapi harus MUG-positif.
- f) Tentukan nilai angka paling memungkinkan (APM) berdasarkan jumlah tabung-tabung EC-MUG yang positif dengan menggunakan tabel Angka Paling Memungkinkan (APM). Nyatakan angka *E. Coli* sebagai "APM/100g".

9 Pelaporan

Berdasarkan interpretasi hasil di atas, nyatakan koliform, fekal koliform dan *E. coli* dengan menggunakan Angka Paling Memungkinkan (APM).

10 Keamanan dan keselamatan kerja

Untuk menjaga keamanan dan keselamatan kerja selama melakukan pengujian maka perlu diperhatikan hal-hal sebagai berikut:

- a) Cuci tangan sebelum dan sesudah melakukan pengujian;
- b) Gunakan jas laboratorium selama melakukan pengujian;
- c) Bersihkan meja kerja sebelum dan sesudah melakukan pengujian;
- d) Bersihkan segera contoh yang tercecer dan mengandung bakteri dengan menggunakan bahan desinfektan;
- e) Media dan isolat bakteri yang sudah digunakan disterilkan terlebih dahulu sebelum dibuang.

Lampiran A
(normatif)
Angka Paling Memungkinkan/APM dengan seri tabung pengenceran

A.1 Latar Belakang

Metode untuk menduga jumlah bakteri dalam suatu produk, dapat menggunakan metoda hitungan mikroskopis, metode hitungan cawan dan penentuan angka paling memungkinkan (APM). Organisme yang mati maupun hidup dapat dihitung dengan metode hitungan mikroskopis, akan tetapi pada APM hanya organisme hidup yang dapat dihitung.

Metode APM adalah metode untuk menghitung jumlah mikroba dengan menggunakan medium cair dalam tabung reaksi yang pada umumnya setiap pengenceran menggunakan 3 atau 5 seri tabung dan perhitungan yang dilakukan merupakan tahap pendekatan secara statistik. Tabung positif ditunjukkan oleh adanya pertumbuhan bakteri dan gas. Nilai APM ini diperoleh dengan anggapan sebagai berikut:

- a) bakteri dalam contoh menyebar secara random;
- b) bakteri dalam contoh tidak berkelompok atau cluster, tetapi saling terpisah;
- c) organisme yang terdapat dalam contoh dapat tumbuh dalam medium selama inkubasi;
- d) kondisi yang sesuai untuk pertumbuhan, seperti media dan waktu inkubasi.

Di dalam penggunaan seri tabung pengenceran tingkat pengenceran yang diperlukan didasarkan pada pendugaan populasi bakteri yang ada dalam contoh. Hasil yang baik adalah jika pada pengenceran yang lebih rendah contoh yang diduga lebih banyak menunjukkan hasil uji positif (adanya pertumbuhan bakteri) dan pada pengenceran lebih tinggi contoh yang diduga lebih sedikit menunjukkan hasil uji negatif (tidak ada pertumbuhan bakteri). Oleh karena itu, jumlah populasi bakteri yang ada dalam contoh diduga tinggi maka contoh harus diencerkan sampai diperoleh tingkat pengenceran yang lebih tinggi sehingga nilai APM maksimum dapat dihitung. Metode pengenceran yang paling mudah adalah dengan melakukan pengenceran 10 kali lipat dengan menggunakan 3 atau 5 seri tabung pengenceran.

Metode APM digunakan untuk menduga organisme dalam jumlah sedikit (kurang dari 100/g) terutama susu, air dan makanan yang mempunyai partikel-partikel lain yang mungkin mengganggu keakurasian perhitungan. Kombinasi tabung-tabung positif yang diperoleh cukup untuk memberikan hasil yang signifikan dan umumnya terdapat dalam tabel APM, sedangkan kombinasi yang tidak mungkin diabaikan. Tabel APM mempunyai tingkat kepercayaan 95%. Jika kombinasi tabung-tabung positif yang diperoleh tidak termasuk dalam tabel APM maka contoh yang asli harus dilakukan pengujian kembali. Dan jika ini tidak dapat dilakukan, maka analisis harus membandingkan dengan tabel APM yang lain untuk menghitung nilai APM berdasarkan hasil yang diperoleh.

A.2 Cara pemilihan kombinasi tabung positif pada 3 dan 5 seri tabung pengencer dalam tabel APM

Penentuan APM dihitung berdasarkan jumlah seri tabung positif pada beberapa pengenceran yang digunakan yang didasarkan pada 3 atau 5 seri tabung pengenceran yang digunakan. Kombinasi yang diambil adalah 3 tingkat pengenceran dengan kaidah sebagai berikut:

Kasus 1 Seluruh tabung pada seri tabung pengenceran (10^{-1} , 10^{-2} , dst) menunjukkan reaksi positif

- Pilih tingkat pengenceran tertinggi yang menghasilkan seluruh tabung positif dan 2 pengenceran berikutnya, seperti contoh a dan b (Tabel A.1).
- Jika pada tingkat pengenceran yang lebih tinggi masih menghasilkan tabung positif (tingkat pengenceran 10^3 menghasilkan 1 tabung positif) maka tingkat pengenceran tersebut tingkat pengenceran tertinggi yang dipilih, seperti pada contoh c (Tabel A.1).
- Jika pada tingkat pengenceran tertentu menghasilkan tabung negatif (tingkat pengenceran 10^3) tetapi tingkat pengenceran berikutnya menghasilkan tabung positif (tingkat pengenceran 10^4 menghasilkan 1 tabung positif) maka yang dinyatakan tabung positif adalah tingkat pengenceran sebelumnya seperti pada contoh d (Tabel A.1).
- Jika pada tingkat pengenceran tertinggi (10^4) masih terdapat tabung positif, maka pilih tingkat pengenceran sebelumnya seperti pada contoh e (Tabel A.1).

Kasus 2 Tidak ada satupun dari seri pengenceran yang menghasilkan seluruh tabung positif

- Lihat pada contoh f (Tabel A.1), jika tingkat pengenceran tertentu menghasilkan tabung positif (10^2) maka pilih 2 tingkat pengenceran sebelumnya.
- Jika pada pengenceran yang lebih tinggi masih menghasilkan tabung positif (pengenceran 10^3 menghasilkan 1 tabung positif) maka tambahkan tabung positif tersebut ke tingkat pengenceran sebelumnya seperti pada Tabel A.1 (contoh g).

Tabel A.1 - Cara pemilihan kombinasi seri tabung pengenceran APM dengan 5 seri tabung pengenceran

Contoh	Tingkat pengenceran					Kombinasi tabung positif	APM/g
	10^0	10^1	10^2	10^3	10^4		
a	5	5	1	0	0	5-1-0	33
b	4	5	1	0	0	5-1-0	33
c	4	4	4	1	0	4-4-1	40
d	5	4	4	0	1	4-4-1	40
e	5	5	5	5	2	5-5-2	5400
f	0	0	1	0	0	0-0-1	0,18
g	4	4	1	1	0	4-4-2	4,7

Tabel A.2 - Indeks APM dengan tingkat kepercayaan 95% untuk berbagai kombinasi hasil positif dari 3 seri tabung pada pengenceran 10^1 , 10^2 dan 10^3

Tabung positif			APM/g	Tk. Kepercayaan		Tabung positif			APM/g	Tk. Kepercayaan	
0.1	0.01	0.001		Bawah	Atas	0.1	0.01	0.001		Bawah	Atas
0	0	0	<3.0	—	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	

SUMBER Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual, Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions, October 2010

Tabel A.3 - Indeks APM dengan tingkat kepercayaan 95% untuk berbagai kombinasi hasil positif dari 5 seri tabung pada pengenceran 10^1 , 10^2 dan 10^3

Tabung positif			APM/g	Tk. Kepercayaan		Tabung positif			APM/g	Tk. Kepercayaan	
0.1	0.01	0.001		Bawah	Atas	0.1	0.01	0.001		Bawah	Atas
0	0	0	<1.8	—	6.8	4	0	2	21	6.8	40
0	0	1	1.8	0.09	6.8	4	0	3	25	9.8	70
0	1	0	1.8	0.09	6.9	4	1	0	17	6	40
0	1	1	3.6	0.7	10	4	1	1	21	6.8	42
0	2	0	3.7	0.7	10	4	1	2	26	9.8	70
0	2	1	5.5	1.8	15	4	1	3	31	10	70
0	3	0	5.6	1.8	15	4	2	0	22	6.8	50
1	0	0	2	0.1	10	4	2	1	26	9.8	70
1	0	1	4	0.7	10	4	2	2	32	10	70
1	0	2	6	1.8	15	4	2	3	38	14	100
1	1	0	4	0.7	12	4	3	0	27	9.9	70
1	1	1	6.1	1.8	15	4	3	1	33	10	70
1	1	2	8.1	3.4	22	4	3	2	39	14	100
1	2	0	6.1	1.8	15	4	4	0	34	14	100

Tabel A.3 - Indeks APM dengan tingkat kepercayaan 95% untuk berbagai kombinasi hasil positif dari 5 seri tabung pada pengenceran 10^1 , 10^2 dan 10^3 (lanjutan)

Tabung positif			APM/g	Tk. Kepercayaan		Tabung positif			APM/g	Tk. Kepercayaan	
0.1	0.01	0.001		Bawah	Atas	0.1	0.01	0.001		Bawah	Atas
1	2	1	8.2	3.4	22	4	4	1	40	14	100
1	3	0	8.3	3.4	22	4	4	2	47	15	120
1	3	1	10	3.5	22	4	5	0	41	14	100
1	4	0	11	3.5	22	4	5	1	48	15	120
2	0	0	4.5	0.79	15	5	0	0	23	6.8	70
2	0	1	6.8	1.8	15	5	0	1	31	10	70
2	0	2	9.1	3.4	22	5	0	2	43	14	100
2	1	0	6.8	1.8	17	5	0	3	58	22	150
2	1	1	9.2	3.4	22	5	1	0	33	10	100
2	1	2	12	4.1	26	5	1	1	46	14	120
2	2	0	9.3	3.4	22	5	1	2	63	22	150
2	2	1	12	4.1	26	5	1	3	84	34	220
2	2	2	14	5.9	36	5	2	0	49	15	150
2	3	0	12	4.1	26	5	2	1	70	22	170
2	3	1	14	5.9	36	5	2	2	94	34	230
2	4	0	15	5.9	36	5	2	3	120	36	250
3	0	0	7.8	2.1	22	5	2	4	150	58	400
3	0	1	11	3.5	23	5	3	0	79	22	220
3	0	2	13	5.6	35	5	3	1	110	34	250
3	1	0	11	3.5	26	5	3	2	140	52	400
3	1	1	14	5.6	36	5	3	3	180	70	400
3	1	2	17	6	36	5	3	4	210	70	400
3	2	0	14	5.7	36	5	4	0	130	36	400
3	2	1	17	6.8	40	5	4	1	170	58	400
3	2	2	20	6.8	40	5	4	2	220	70	440
3	3	0	17	6.8	40	5	4	3	280	100	710
3	3	1	21	6.8	40	5	4	4	350	100	710
3	3	2	24	9.8	70	5	4	5	430	150	1,100
3	4	0	21	6.8	40	5	5	0	240	70	710
3	4	1	24	9.8	70	5	5	1	350	100	1100
3	5	0	25	9.8	70	5	5	2	540	150	1700
4	0	0	13	4.1	35	5	5	3	920	220	2600
4	0	1	17	5.9	36	5	5	4	1600	400	4600
					5	5	5	>1600	700	—	5
SUMBER Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual, Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions, October 2010											

Lampiran B
(normatif)
Pembuatan media

B.1 Brilliant green lactose bile broth

<i>Peptone</i>	10 g
<i>Lactose</i>	10 g
<i>Oxgall</i>	20 g
<i>Brilliant green</i>	0,0133 g
<i>Aquades</i>	1 L

Larutkan *Peptone* dan *Lactose* dalam 500mL *Aquades*. Tambahkan 20 gram *Oxgall* dalam 200mL *Aquades*. Atur pH 7,0 – 7,5. Aduk dan tambahkan *Aquades* hingga 975 mL. Atur pH 7,4 tambahkan 13,3mL 0,1% *Brilliant green*. Tepatkan hingga 1 L. Pipet ke dalam tabung-tabung yang berisi tabung *durham*. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121 °C. Media ini tersedia secara komersial.

B.2 Lauryl tryptose broth (LTB)

<i>Tryptose</i> atau <i>trypticase</i>	20 g
<i>Lactose</i>	5 g
K_2HPO_4	2,75 g
KH_2PO_4	2,75 g
<i>NaCl</i>	5 g
<i>Sodium lauryl sulfate</i>	0,1 g
<i>Aquades</i>	1 L

Campur bahan-bahan tersebut diatas dan pipet 9 mL ke dalam tabung ukuran 20 mm x 150 mm yang berisi tabung *durham* ukuran 10 mm x 75 mm. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121 °C, pH media $6,8 \pm 0,2$. Media ini tersedia secara komersial.

B.3 EC Broth

<i>Trypticase</i> atau <i>tryptose</i>	20 g
<i>Bile salt No.</i>	31,5 g
<i>Lactose</i>	5 g
K_2HPO_4	4 g
KH_2PO_4	1,5 g
<i>NaCl</i>	5 g
<i>Aquades</i>	1 L

Campur bahan-bahan tersebut diatas dan pipet 9 mL ke dalam tabung ukuran 20 mm x 150 mm yang berisi tabung *durham* ukuran 10 mm x 75 mm. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121 °C. Media ini tersedia secara komersial.

B.4 Levine's eosin methylen blue (L-EMB) agar

<i>Peptone</i>	10 g
<i>Lactose</i>	10 g
KH_2PO_4	2 g
<i>Bacto agari</i>	15 g
<i>Eosin</i>	0,4 g
<i>Methylen blue</i>	0,065 g
<i>Aquades</i>	1 L

Aduk hingga *peptone*, KH_2PO_4 dan agar kedalam 1 L *Aquades*. Ambil 100 mL atau 200 mL campuran tersebut dan sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121 °C. Sebelum digunakan lelehkan masing-masing 100 mL dan tambahkan 5mL larutan steril *Lactose* 20% dan 2 mL larutan *Eosin* 2% serta 4,3 mL larutan *methylene blue* 0,15%, didihkan kembali hingga 1 L. Ambil 100 mL atau 200 mL dan sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121 °C. Media ini tersedia secara komersial.

B.5 Tryptone broth, 1%

<i>Tryptone</i> atau <i>trypticase</i>	10 g
<i>Aquades</i>	1 L

Larutkan bahan tersebut dan pipet 5 mL ke dalam tabung ukuran 16 mm x 150 mm. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121 °C. Media ini tersedia secara komersial.

B.6 MRVP broth**Medium 1**

<i>Buffered peptone water powder</i>	7 g
<i>Glucose</i>	5 g
KH_2PO_4	5 g
<i>Aquades</i>	1 L

Medium 2

<i>Pancreatic digest casein</i>	3,5 g
<i>Peptic digest</i> dari jaringan hewan	3,5 g
<i>Dextrose</i>	5 g
<i>Potasium phosphate</i>	5 g
<i>Aquades</i>	1 L

Larutkan bahan-bahan tersebut dalam *aquades*. Pipet 10 mL ke dalam tabung ukuran 16 mm x 150 mm. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 118 °C – 121 °C. Media ini tersedia secara komersial.

B.7 Simmon citrate agar

<i>Sodium citrate</i>	2 g
NaCl	5 g
K_2HPO_4	1 g
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1 g

MgSO ₄	0,2 g
<i>Bromthymol blue</i>	0,08 g
<i>Bacto agar</i>	15 g
<i>Aquades</i>	1 L

Aduk dan didihkan 1 menit – 2 menit sampai seluruh agar larut. Pipet ke dalam tabung ukuran 16 mm x 150 mm. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 118 °C – 121 °C. Sebelum beku miringkan tabung hingga memperoleh agar miring 4 cm – 5 cm dan agar tegak 2 cm – 3 cm. Media ini tersedia secara komersial.

B. 8 *Plate count agar*

<i>Tryptone</i>	5 g
<i>Yeast extract</i>	22,5 g
<i>Dextrose</i>	1 g
<i>Bacto agar</i>	15 g
<i>Aquades</i>	1 L

Panaskan seluruh bahan tersebut hingga mendidih. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121 °C. Media ini tersedia secara komersial.

B.9 *Lactose broth*

<i>Beef extract</i>	3 g
<i>Pepton</i>	5 g
<i>Lactose</i>	5 g
<i>Aquades</i>	1 L

Campur dan panaskan semua bahan tersebut hingga mendidih, ukur pH 6,9 ± 0,2 Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121 °C. Sebelum digunakan, tuang sebanyak 225 mL ke dalam erlenmeyer. Media ini tersedia secara komersial.

B.10 *LTB – MUG medium*

Siapkan Media LTB (B.2) dan sebelum sterilisasi tambahkan 50 mg 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG). Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121 °C. Media ini tersedia secara komersial

B.11 *EC – MUG Medium*

Siapkan Media EC (B.3) dan sebelum sterilisasi tambahkan 50 mg 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG). Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121 °C. Media ini tersedia secara komersial.

Lampiran C
(normatif)
Pembuatan pereaksi

C.1 Larutan *Butterfield's phosphate buffer*

Larutan stok:

KH_2PO_4	34 g
<i>Aquades</i>	500 mL

Atur pH 7,2 dengan 1N NaOH. Tepatkan volume larutan tersebut hingga 1 L dengan penambahan *Aquades*. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121 °C. Simpan dalam *refrigerator*.

Larutan kerja :

Pipet 10 mL larutan stok dan tepatkan hingga 1 L dengan penambahan *Aquades*. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121 °C.

C.2 Larutan 0,5% *pepton water*

Pepton	5 g
<i>Aquades</i>	1 L

Panaskan seluruh bahan tersebut hingga mendidih. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121 °C.

C.3 Pereaksi Kovacs

<i>p</i> -Dimethylaminobenzaldehyde	5 g
<i>Amyl alcohol</i>	75 mL
HCl (<i>concentrate</i>)	25 mL

Larutkan *p*-Dimethylaminobenzaldehyde dalam *amyl alcohol*. Pelan-pelan tambahkan HCl. Simpan pada suhu 4 °C. Untuk uji *indol* tambahkan 0,2 mL – 0,3 mL ke dalam kultur bakteri dalam *tryptone broth*. Warna merah pada permukaan lapisan menunjukkan reaksi positif.

C.4 Pereaksi VP

Larutan 1

<i>Alpha naphthol</i>	5 g
<i>Alcohol</i>	100 mL

Larutan 2

KOH ₄	0,1 g
<i>Aquades</i>	100 mL

Cara uji VP :

Pindahkan 1mL kultur setelah inkubasi 48 jam dan tambahkan 0,6 mL larutan 1 dan 0,2 mL larutan 2. Aduk, untuk mempercepat reaksi tambahkan sedikit kreatin. Simpan pada suhu

ruang selama 4 jam. Reaksi positif jika terbentuk warna merah muda *eosin* sampai merah mirah delima (*ruby*).

C.5 Indikator *methyl red*

<i>Methyl red</i>	0,1 g
<i>Ethanol</i> 95%	300 mL

Larutkan *methyl red* dalam *ethanol* dan tepatkan dengan *Aquades* hingga 500 mL.

C. 6 Pereaksi pewarnaan Gram

Hucker's crystal violet

Larutan A

<i>Crystal violet</i>	2 g
<i>Ethyl alcohol</i> , 95%	20 mL

Larutan B

<i>Ammonium oxalat</i>	0,8 g
<i>Aquades</i>	80 mL

Campur larutan A dan B. Simpan selama 24 jam dan saring dengan kertas saring.

Gram's *iodine*

<i>Iodine</i>	1 g
<i>Potassium iodine</i>	2 g
<i>Aquades</i>	300 mL

Masukkan KJ dalam mortar, tambahkan *iodine* dan gerus dengan alat penggiling selama 5 detik – 10 detik. Tambahkan 1 mL air dan gerus kemudian tambahkan 5 mL. Tambahkan lagi 10 mL dan gerus. Tuang larutan ini dalam botol pereaksi. Bilas mortar dan alat penggilingnya dan tambahkan air hingga volume 300 mL.

Hucker's counterstain (larutan stok)

<i>Safranin O</i>	2,5 g
<i>Ethanol</i> , 95%	100 mL

Larutan kerja : larutkan 10 mL larutan stok ke dalam 90 mL *Aquades*.

C.7 Prosedur pewarnaan Gram

Buat usapan bakteri yang akan diwarnai diatas gelas preparat. Usahkan usapan yang dibuat setipis mungkin. Fiksasi gelas preparat tersebut dengan melewati melalui api burner. Warna film selama 1 menit dengan larutan *Hucker's crystal violet* dan cuci sebentar dengan air. Bubuhkan larutan gram *Iodine* selama 1 menit. Cuci dengan air mengalir. Lakukan dekolorisasi (penghilangan warna) dengan *Ethanol* 95% hingga seluruh warna biru hilang (kira-kira 30 detik). Cuci kembali dengan air mengalir. Bubuhkan larutan *Hucker's counterstain* (*safranin*) selama 1 menit dan cuci kembali dengan air mengalir, keringkan dan periksa di bawah mikroskop.

Bibliografi

Association of Official Analytical Chemistry (AOAC), 2000, Official Methods of Analysis, 17th Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual, 2010, Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions.

Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual, Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria, Updated 02/13.

Fish Inspection Branch Fisheries and Ocean Canada, 1979, Official Chemical Method.

